

University of Groningen

Azobenzene-substituted phosphate amphiphiles

Kuiper, Johanna

IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

Document Version

Publisher's PDF, also known as Version of record

Publication date:

2005

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

Citation for published version (APA):

Kuiper, J. (2005). *Azobenzene-substituted phosphate amphiphiles: effect of light-induced trans-cis isomerisation on vesicular properties and the channel protein MscL*. [Thesis fully internal (DIV), University of Groningen]. s.n.

Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

Samenvatting

Levende organismen zijn opgebouwd uit ten minste één cel. De mens is opgebouwd uit ca. 10^{13} cellen met zo'n 220 verschillende celtypes. Alle cellen zijn omgeven door een celmembraan. De basiscomponenten van het celmembraan zijn voornamelijk fosfolipiden, cholesterol en eiwitten. De lipidemoleculen bevatten een hydrofiel (waterminnend) en een hydrofoob (watervrezend) deel. Moleculen met deze combinatie van eigenschappen worden ook wel surfactanten of amfifielen genoemd. Deze moleculen hebben in water vaak de neiging om aggregaten te vormen. De hydrofobe gedeeltes van verschillende moleculen zoeken elkaar op en het hydrofiele gedeelte van elk molecuul (kopgroep) richt zich naar de waterfase. De drijvende kracht hierachter wordt geleverd door de watermoleculen. Doordat de watermoleculen liever interacties met elkaar aangaan dan met de hydrofobe gedeeltes van de surfactanten, sluiten ze de hydrofobe gedeeltes buiten en deze aggregeren dan met elkaar (via hydrofobe interacties). Surfactanten kunnen verschillende aggregaten vormen in water en deze zijn weergegeven in Figuur 1.1 (Hoofdstuk 1). Eén type aggregaat is de bilaagvesicle, een blaasje met binnenin een watercompartiment. Een biologische cel is in principe ook een vesicle waarbij de fosfolipiden de surfactanten zijn. Vesicles dienen dan ook vaak als modelsysteem voor de bestudering van biologische celmembranen.

Het celmembraan heeft verscheidene functies zoals: bescherming van de inhoud van de cel tegen invloeden van buiten, aanvoer van voedingsstoffen, afvoer van afvalstoffen en signalering (communicatie). Alleen kleine moleculen (b.v. O_2 , CO_2 en H_2O) kunnen door het celmembraan diffunderen. Grotere moleculen worden meestal getransporteerd met behulp van membraaneiwitten. Ook actief transport, tegen de concentratie gradiënt in, gebeurt via membraaneiwitten.

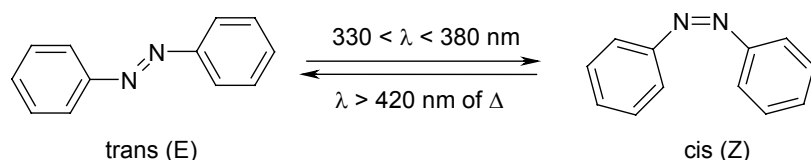
MscL is een veelvoorkomend transporteiwit in celmembranen en is betrokken bij het reguleren van de turgor in de cel. Wanneer een cel door een osmotisch verschil zwelt en dreigt te knappen, openen deze eiwitten hun kanalen zodat ionen en kleine moleculen de cel kunnen verlaten. Op deze wijze kan een cel een osmoseverschil overleven. Resultaten van eerdere studies lieten zien dat de opening van MscL wordt geïnduceerd door veranderingen in het membraan als gevolg van het zwellen. Daarom worden deze eiwitkanalen "mechanisch gevoelig" genoemd. MscL betekent dan ook "mechano-sensitive channel of large conductance".

Verscheidene wetenschappers hebben modellen gepubliceerd om deze veranderingen in het membraan (simpel) weer te geven. Een voorbeeld is het laterale drukprofiel model. Dit model is gebaseerd op de aanname

dat op verschillende dieptes in het membraan verschillende laterale drukken heersen (Hoofdstuk 1). De variatie van de laterale druk als gevolg van de positie in het membraan wordt het laterale drukprofiel genoemd. Laterale drukprofielen kunnen tot nu toe alleen nog maar verkregen worden via simulatie met een computer. Voor het experimenteel nauwkeurig meten van het laterale drukprofiel is nog geen geschikte techniek beschikbaar.

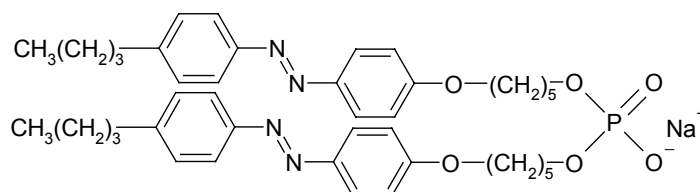
Het idee dat de functie van sommige membraaneiwitten wordt gereguleerd door veranderingen in de ketenpakking van het membraan leidde tot interesse in membranen waarin gemakkelijk deze veranderingen geïnduceerd kunnen worden. Het doel van het promotieonderzoek was dan ook het maken van membranen waarvan de eigenschappen veranderd kunnen worden door bijvoorbeeld bestraling met licht. Een tweede doel was om te kijken of regulatie van de opening en sluiting van het kanaaleiwit MscL mogelijk was met behulp van deze lichtgevoelige membranen.

Om een lichtgevoelig membraan te construeren zijn surfactanten nodig met een lichtgevoelige groep. Gekozen werd voor de azobenzeengroep omdat bekend was dat deze functionaliteit gemakkelijk, met licht van de juiste golflengte, geïsomereerd kan worden van het trans-isomeer (E) naar het cis-isomeer (Z) en vice versa (Figuur 1). Ook is bekend dat er geen nevenreacties optreden. Het trans-isomeer van azobenzeen is de thermisch meest stabiele vorm.



Figuur 1 De trans en cis isomeren van azobenzeen.

De synthese van de lichtgevoelige surfactanten wordt beschreven in hoofdstuk 2. De serie surfactanten bestaan uit een fosfaat kopgroep en uit één of twee azobenzeengesubstitueerde alkylketens, waarbij de positie van de azobenzeengroep in de keten is gevarieerd. Figuur 2 laat een voorbeeld zien.



Figuur 2 Een azobenzeengesubstitueerd surfactant, DT Azo-5P.

SAMENVATTING

Het was niet mogelijk om vesicles te vormen bestaande uit alleen de lichtgevoelige dubbelstaartige amfifielen. Vesicle-vorming was wel mogelijk wanneer de lichtgevoelige dubbelstaartige surfactanten gemengd werden met vesicle-vormende surfactanten zoals bv. DOPC, een natuurlijk fosfolipide.

Een fenomeen dat op kan treden in membranen met azobenzeengesubstitueerde surfactanten is H-aggregatie. Dipool-dipool interacties tussen azobenzengroepen, die parallel naast elkaar gesitueerd zijn, liggen aan de basis van dit verschijnsel. H-aggregatie wordt gekenmerkt door een verschuiving van de absorptieband rond 350 nm in het UV-Vis spectrum naar lagere golflengtes. In hoofdstuk 3 is beschreven dat verscheidene factoren invloed hebben op de mate van H-aggregatie waaronder de wijze van bereiding van de vesicles. Daarnaast werd duidelijk dat H-aggregatie kan optreden zowel met als zonder gelijktijdige domeinvorming. Een link werd gelegd tussen de golflengte van adsorptie en de mate van H-aggregatie en eventuele domeinformatie.

Uit bestralingsexperimenten werd duidelijk dat de azobenzeengesubstitueerde fosfaten gemakkelijk te isomeriseren zijn van trans naar cis (365 nm) en vice versa (436 nm). Er traden geen nevenreacties op en hoge opbrengsten van het cis-isomeer werden gemeten. De thermische halfwaardetijden van het cis-isomeer zijn bepaald en deze waarden hangen af van de positie van de azobenzengroep in de keten en van de concentratie lichtgevoelig surfactant. Wanneer de azobenzeeneenheid dicht bij de kopgroep (de fosfaatgroep) is gepositioneerd, worden kortere halfwaardetijden gemeten.

Het effect van trans-cis isomerisatie van de azobenzeengesubstitueerde surfactanten op de permeabiliteit van het membraan is bestudeerd met fluorescentiespectroscopie. Een hoge concentratie van een wateroplosbare fluorescente kleurstof werd ingesloten in vesicles bestaande uit DOPC en DT Azo-5P. De niet ingesloten kleurstofmoleculen werden verwijderd met behulp van filtratie. Op deze manier kan de lekkage van de kleurstof gevolgd worden met fluorescentiespectroscopie omdat de fluorescentie van de ingesloten kleurstof bij hoge concentraties gedoofd is. Bij optreden van lekkage van de probe uit de vesicle zal de fluorescentie toenemen t.g.v verdunning van de kleurstof. Zonder trans-cis isomerisatie trad er geen lekkage op van de kleurstof tijdens een meetperiode van tenminste één uur.

Het bleek dat boven een concentratie van 20 mol% DT Azo-5P in DOPC vesicles lekkage van de fluorescente probe optrad na lichtgeïnduceerde trans-cis isomerisatie. De lekkage, als gevolg van de trans-cis isomerisatie, nam toe met een toenemende concentratie DT Azo-5P. Met

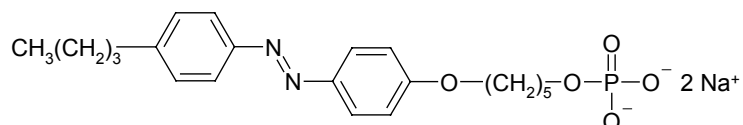
cryo-elektronenmicroscopie werd aangetoond dat trans-cis isomerisatie leidt tot het openbreken van de bilag van de vesicles.

In hoofdstuk 4 is het effect van trans-cis isomerisatie van het lichtgevoelige surfactant DT Azo-5P op de opening en sluiting van het kanaaleiwit MscL bestudeerd. De zuivering van het kanaaleiwit MscL wordt in dit hoofdstuk beschreven en ook de reconstitutie van dit eiwit in een membraan gevormd uit DT Azo-5P en DOPC. Voor de bestudering van het openen en sluiten van het kanaaleiwit zijn twee technieken gebruikt: fluorescentiespectroscopie (lekkage van een kleurstof) en patch-clamp experimenten. Na bestraling van de liposomen, leidend tot trans-cis isomerisatie van de lichtgevoelige surfactanten, werd een extra lekkage van 10% kleurstof uit de liposomen waargenomen in vergelijking met een controle-experiment.

Een groter effect van trans-cis isomerisatie van de lichtgevoelige surfactanten op de opening en sluiting van het kanaaleiwit MscL is waargenomen met patch-clamp. Tijdens een patch-clamp experiment wordt een deel van het membraan in een zeer fijne glazen pipet gezogen. Doordat het membraanfragment een afsluiting vormt, kan uitwisseling van ionen tussen de binnenkant van de pipet en de buitenkant alleen maar plaats vinden als het kanaaleiwit is geopend. De techniek is zodanig gevoelig dat de elektrische stroom, die veroorzaakt wordt door opening van een enkel eiwitkanaal, gemeten kan worden. Het bleek dat, na trans-cis isomerisatie van het lichtgevoelige surfactant, het kanaaleiwit MscL gemiddeld gezien zich vier keer vaker in open toestand bevond dan voor isomerisatie. De open waarschijnlijkheid nam weer af na thermische of lichtgeïnduceerde cis-trans isomerisatie. Met de verkregen resultaten is duidelijk geworden dat sturen van het openen en sluiten van het kanaaleiwit MscL mogelijk is met lichtgevoelige membranen.

Hoofdstuk 5 is gewijd aan drie fosfaatsurfactanten met één azobenzeengesubstitueerde keten. Per surfactant is de azobenzeeneenheid op een andere plaats in de keten gesitueerd. Uit experimenten bleek dat de surfactanten een beperkte oplosbaarheid in water hebben. Met behulp van cryo-elektronenmicroscopie, fluorescentiespectroscopie en oppervlaktespanningsmetingen werd aangetoond dat deze surfactanten micellen vormen. De CMC kon voor twee surfactanten bepaald worden. Vesicles zijn gemaakt welke bestonden uit DOPC en de eenstaartige lichtgevoelige surfactanten. Ook in deze systemen was het mogelijk de lichtgevoelige surfactanten te schakelen van trans naar cis en vice versa. Gelijke trends werden gevonden in de thermische halfwaardetijden van het cis-isomeer in vergelijking met de lichtgevoelige surfactanten met twee azobenzeengesubstitueerde ketens.

De permeabiliteit van DOPC vesicles na toevoeging van trans of cis ST Azo-5P (Figuur 3) is bestudeerd met fluorescentiespectroscopie.



Figuur 3 Structuur van ST Azo-5P.

Experimenteel is vastgesteld dat er een snelle binding optreedt, binnen enkele seconden, van ST Azo-5P moleculen aan DOPC vesicles. Ondanks dat, werd er geen lekkage van de kleurstof geconstateerd na toevoeging van trans of cis ST Azo-5P. Ook is nagegaan of met behulp van trans-cis isomerisatie van ST Azo-5P het mogelijk was het openen en sluiten van het eiwitkanaal MscL te sturen. Bij deze experimenten is gebruik gemaakt van fluorescentiespectroscopie met een kleurstof. Enigszins tegen de verwachting in bleek dat het openen van MscL niet mogelijk was met behulp van trans-cis isomerisatie van het eenstaartige fosfaat.

In Hoofdstuk 6 is het effect van trans-cis isomerisatie van de lichtgevoelige surfactanten op het membraan in meer detail bestudeerd. Er is ondermeer gekeken naar het effect van trans-cis isomerisatie op de faseovergangstemperatuur. Voor deze experimenten zijn vesicles bereid van een mengsel van een lichtgevoelig surfactant en een matrixlipide met een faseovergangstemperatuur ruim boven 0°C. Voor de vesicles met daarin de lichtgevoelige surfactanten met één en met twee azobenzeengesubstitueerde ketens werd in beide gevallen een verlaging van de faseovergangstemperatuur gemeten na trans-cis isomerisatie. Het effect nam toe als de azobenzeengroep in de keten dicht bij de kopgroep gesitueerd was. Aan de hand van ^2H NMR metingen, MD simulaties en DSC metingen is geconcludeerd dat de ketenorde in het membraan afneemt bij trans-cis isomerisatie. Dit feit onderbouwt de resultaten beschreven in Hoofdstuk 4. In de literatuur wordt aangenomen dat MscL moeilijker opent als er een toename is van de orde in het membraan. In het hier beschreven onderzoek werd een afname van de orde in de ketenpakking ten gevolge van cis-trans isomerisatie gevonden en deze afname leidt klaarblijkelijk tot een toename in de open waarschijnlijkheid van MscL.

De resultaten beschreven in dit proefschrift vormen een aanzet tot verder onderzoek. Vele facetten van lichtgevoelige membranen kunnen meer diepgaand bestudeerd worden. Het onderzoek heeft duidelijk gemaakt dat trans-cis isomerisatie van de lichtgevoelige surfactanten een significant effect heeft op de eigenschappen van membranen en de in het membraan gebonden eiwitten. Als een consequentie daarvan is het mogelijk gebleken om via deze weg de opening en sluiting van een

kanaaleiwit aan te sturen. In Hoofdstuk 7 zijn de resultaten van dit proefschrift in een breder kader geplaatst.

